

UNTERSUCHUNGEN ZUR QUALITÄT DES PELLET-KRYOSPERMAS

**DIE ABHÄNGIGKEIT DER ENDMOTILITÄT VON VERSCHIEDENEN
ADAPTATIONSTEMPERATUREN UND DER GEFRIERUNG AUF
METALL- UND KOHLENSÄURESCHNEE-PLATTEN**

von

Rajab - Ali Emran

aus

Firuzkuh / Iran

Aus der Klinik für Frauenheilkunde mit

Poliklinik und Hebammenschule

der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. K.-G. Ober

UNTERSUCHUNGEN ZUR QUALITÄT DES PELLET-KRYOSPERMAS

**DIE ABHÄNGIGKEIT DER ENDMOTILITÄT VON VERSCHIEDENEN
ADAPTATIONSTEMPERATUREN UND DER GEFRIERUNG AUF
METALL- UND KOHLENSÄURESCHNEE-PLATTEN**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

dem Fachbereich Medizin

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Rajab - Ali Emran

aus

Firuzkuh / Iran

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. K.-G. Bregulla

Korreferent: Prof. Dr. K.-G. Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 24. NOV. 1977

Inhaltsübersicht

	Seite
Einleitung	1
Methodik	5
Ergebnisse und Diskussion	6
Methodik	7
Ergebnisse und Diskussion	9
Zusammenfassung	10
Literaturverzeichnis	13
Biografische Daten	15



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Die Qualität des tiefgefrorenen menschlichen Samens befriedigt heute noch nicht. Man kommt zu dieser Wertung, wenn man die Ergebnisse der Kryokonservierung des Human-spermas bedenkt. Dabei sind nur die Erfolge der Tiefkühlkonservierung mit Ejakulaten, die normalen andrologischen Normen entsprechen, berücksichtigt. Die Motilitätsraten qualitativ unbefriedigender Ejakulate, etwa bei der Oligozoospermie oder den für die Einfrierung ungeeigneten Ejakulaten, den "schlechten Einfrierern", bei normalen andrologischen Parametern, liegen noch unter den oben beschriebenen Ergebnissen (1, 4, 11).

Eine weitere Verbesserung der Qualität des Kryospermas wäre durch zunehmende Erkenntnisse über die Veränderungen in der Samenzelle während des Gefriervorganges zu erwarten (9, 10). Das gilt weniger für die Reduzierung des Stoffwechsels als vielmehr für Elektrolytverschiebungen und intrazelluläre Kristallbildung. Die Schwierigkeiten, einzelne Samenzellen während des Gefriervorganges im mikroskopischen oder elektronenmikroskopischen Bereich zu beobachten und ihre Reaktion während dieser Einfrier- und Auftauphasen zu analysieren, sind begrenzt. Tastversuche, bei denen nur einzelne Abschnitte des Einfriervorganges verändert werden, sind deshalb eine Möglichkeit, den Einfluß abhängiger Variabler zu erkennen. Dabei wird als härtestes Kriterium die Motilität der Spermien geprüft (6). Morphologische Daten oder

bekannte enzymatische Reaktionen werden seltener zur Charakterisierung der Einflüsse der Kryotechnik genannt.

In der Veterinärmedizin sind die Erfolge der Sperma-Tiefkühlkonservierung zum größten Teil durch dieses Vorgehen erreicht worden (14). Die eigentliche Grundlagenforschung der Veränderung einer Zelle in der tiefen Kälte hat nur bedingt zur Verbesserung des Kryospermas beigetragen. Wenn diese Entwicklung in der Tiermedizin letztlich ein guter Weg war, so könnte er es auch in der Humanmedizin sein. Bei einem Motilitätsverlust von 30 - 70 % bei der Kryokonservierung des Humanspermas besteht kein Zweifel an einer notwendigen Verbesserung. Das in den 60er Jahren beschriebene Verfahren von BEHRMAN und SAWADA zur Tiefgefrierung menschlichen Samens wird in den USA seit dieser Zeit weitgehend unverändert praktiziert. Die einfachere Einfrier-technik der Spermaportion in Pailletten, für die Veterinärmedizin durch CASSOU beschrieben, ist nur von wenigen für das menschliche Kryosperma übernommen worden (8). Die Einfrierung des mit einem protektiven Medium vermischten Samens in Tropfenform als Pellet, auch eine Möglichkeit Kryosperma zu gewinnen, die in der Veterinärmedizin zunehmend Bedeutung erlangt (14), ist im angloamerikanischen Raum für das Humansperma kaum gebraucht, in der BRD aber von VASTERLING für die Gefrierkonservierung menschlicher Ejakulate als gut brauchbar angegeben (16).

Die Aufarbeitung des Kryospermas als Pellet hat gegenüber der Ampulle und Paillette Vorteile. Die technische Aufarbeitung ist außerordentlich einfach und kann in einem sehr kurzen Zeitraum erfolgen. Die Ergebnisse dieser Einfrier-technik sind, soweit es die Qualität des Kryospermas betrifft, überzeugend (16). Das Einfrieren des Pellets auf einer Kohlensäureschnee-Platte ist einfach, stößt dort, wo Trockeneis schwer lieferbar oder haltbar ist, aber auf Schwierigkeiten. BARKEY hat deshalb die Herstellung von Pellets auf teflonbeschichteten Aluminiumplatten empfohlen. Die Platten werden durch Stickstoffdampf auf eine vorgewählte Temperatur im Minusbereich abgekühlt. Die Abkühlgeschwindigkeit der Pellets läßt sich durch eine unterschiedliche Temperatur im Bereich der Stickstoffdampfphase beeinflussen. Bei gleichbleibender Temperatur wäre die Einfriergeschwindigkeit der Pellets nur noch durch die Größe des Pellet-Volumens zu variieren. Die Abhängigkeit der Qualität des Pelletkryospermas von der Pelletgröße, das betrifft Volumina zwischen 0,01 und 1 ml, ist bekannt (1). Danach kann für die Herstellung der Pellets ihr Volumen in dem oben angegebenen Bereich als abhängige Variable vernachlässigt werden.

BARKEY hat für sein Verfahren ein gutes technisches Gerät beschrieben und mit dem auf diese Weise tiefkühlkonservierten Samen nach homologen Inseminationen Schwangerschaften erreicht (2). Der Stellenwert dieses Verfahrens bleibt aber unklar, soweit es die Qualität des Kryospermas

betrifft, solange vergleichende Untersuchungen über die Motilität des Kryospermas mit dem bereits bekannten Verfahren der Einfrierung auf Kohlensäureschnee-Platten fehlen. Ihre Ergebnisse sollen hier im Zusammenhang mit dem Einfluß der Adaptionszeit mitgeteilt werden.

METHODIK

10 unausgesuchte Rest-Ejakulate, die aus der andrologischen Ambulanz kamen, wurden aufgearbeitet. Spender waren Männer im Alter von 20 bis 31 Jahren. Bei einem Volumen zwischen 2,2 und 3,7 ml schwankte die Ausgangsmotilität zwischen 5,9 und 71 %. Nach der Verflüssigung der Ejakulate bei Raumtemperatur von etwa 22° C, durchschnittlich nach 20 Minuten, wurden die Ejakulate mit einem NAGASE-Verdünner als protektives Medium im Verhältnis 1 : 1 gemischt und anschließend je Einzelejakulat so viele Portionen hergestellt, daß bei unterschiedlichen Adaptationstemperaturen von +5° und +22° C jeweils gleiche Portionen nach 15, 30 und 60 Minuten Adaptationszeit zum weiteren Einfrieren als Pellets vorhanden waren.

Die Pellets blieben zum Durchfrieren auf Trockeneis (-79° C) etwa 5 Minuten und kamen dann anschließend direkt in den flüssigen Stickstoff (- 196° C) zur Aufbewahrung.

Die Lagerungsdauer der eingefrorenen Pellets bis zum Auftauen lag zwischen 3 und 4 Tagen. Die Pellets kamen zum Auftauen in ein Reagenzglas. Es stand in einem Wasserbad mit + 35° C. Die erneute Bestimmung der Spermienmotilität, die Endmotilität (EM) und ihr Vergleich mit der Ausgangsmotilität (AM) läßt eine Aussage über den Motilitätsverlust in Abhängigkeit von der Adaptationszeit des Spermias zu. Der Vergleich verschiedener Ejakulate ist durch den Recovery Wert möglich. Das ist die Endmotilität bezogen auf 100 % Ausgangsmotilität.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Tabelle 1 sind die einzelnen Daten in Abhängigkeit von der Adaptationszeit und Adaptationstemperatur eingetragen. Für jede Bestimmung wurden zwischen 3 bis 7 Pellets gemeinsam aufgetaut und von dieser Ejakulatportion 5 Bestimmungen zur Errechnung der Endmotilität durchgeführt. Die Mittelwerte sind dann die in der Tab. 1 eingetragenen Zahlen. Bei einer statistischen Bearbeitung^{*)} mit dem FRIEDMANN-Test lassen sich weder für die Adaptation bei + 5° C noch bei + 22° C unterschiedliche Endmotilitätsergebnisse errechnen. Das gilt sowohl für die gleichen Adaptationszeiten als auch für den Vergleich verschiedener Adaptationszeiten, soweit sie im Bereich zwischen 15 und 60 Minuten liegen.

Den Einfluß längerdauernder Adaptationszeiten hat früher bereits RUDOWSKI untersucht. Seine Ergebnisse sind übertragbar.

*) Herrn Dr. Prestele, Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Erlangen-Nürnberg (Leiter: Prof.Dr.med. Horbach), danken wir für die **Be-
arbeitung der Daten.**

Als zweites Problem interessierte bei der Pellet-Kryospermakonservierung inwieweit die auf Trockeneis oder Metallplatten gefrorenen Pellets bei gleichen oder unterschiedlichen Temperaturen sich in ihrer Endmotilität voneinander unterschieden. Dabei sollte eine Wertigkeit dieser Verfahren versucht werden zu erreichen.

Methodik:

Für die Aufarbeitung wurden wieder 10 unausgesuchte Restejakulate aus der andrologischen Ambulanz genommen, deren Volumen zwischen 2,3 und 3,8 ml betrug. Die Ausgangsmotilität lag zwischen 54 und 88,5 %. Nach der Verflüssigung wurden die Ejakulate bei Raumtemperatur mit dem gleichen Verdünnner (NAGASE) als protektives Medium im Verhältnis 1 : 1 gemischt und anschließend bei einer Adaptationstemperatur von + 5° C für 10 Minuten adaptiert. Die einzelnen Ejakulate wurden dann in 2 verschiedengroße Portionen geteilt und die erste Portion als Pellet mit einem Volumen von 0,1 ml auf der Kohlensäureschnee-Platte eingefroren. Die zweite Portion, ebenfalls 0,1 ml voluminöse Pellets, froren auf einer Metallplatte bei Temperaturen von -20° C, -40° C, -60° C, -80° C, -100° C und -120° C ein.

Die Pellets blieben auf dem Trockeneis etwa 5 Minuten zum durchfrieren und kamen anschließend zur Lagerung und Aufbewahrung in mit flüssigem Stickstoff gefüllte Container.

Für die Abkühlung der Metallplatten wurde eine BF 4^{*)} Gefrierkammer benutzt. Die Temperaturfühler waren in der Kammer und an der Platte so plaziert, daß erst jeweils nach Erreichen nicht nur der umgebenden, sondern auch der Plattentemperatur die Pellets zum Einfrieren aufgetropft wurden. Das Anfrieren der Pellets an der Aluminiumplatte wurde bei Temperaturen von -20° C durch das Auftragen eines Silicon-Sprays reduziert. Bei höheren Temperaturen erübrigte sich das Aufspritzen des Silicons. Die Verweildauer der Pellets auf der Metallplatte entsprach der Lagerungszeit auf der Kohlensäureschnee-Platte. Dann wurden die Pellets ebenfalls in flüssigen Stickstoff umgefüllt und nach gleicher Lagerungsdauer zur Bestimmung der Endmotilität aufgetaut. Für das Auftauen wurde die bereits in der ersten Versuchsanordnung beschriebene Methodik genutzt.

*) Gefriergerät der Firma Union Carbide / USA

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Von den 10 Ejakulaten, die auf dem Trockeneis oder Metallplatten eingefroren wurden, ließ sich durch eine entsprechende Portionierung ein homogenes Kollektiv schaffen. Die Werte der Ausgangs- (AM) und Endmotilität (EM) sind als Recovery-Werte in der Tabelle 2 eingetragen. Die Daten sind Mittelwerte von jeweils 6 gemeinsam aufgetauten Pellets, die unter gleichen Bedingungen eingefroren wurden. Der in der Tabelle für die Endmotilität eingetragene Mittelwert ergab sich aus 5 Einzelbestimmungen.

Die statistische Berechnung mit dem FRIEDMANN-Test zeigt einen signifikanten Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 1\%$ zwischen den sieben unterschiedlichen Einfrierungsverfahren, wobei die Differenz zwischen den Gruppen 1 und 3, 1 und 4, 1 und 5, 1 und 6, und 1 und 7 besteht. Danach ist die Kryokonservierung der menschlichen Ejakulate auf den Kohlensäureschnee-Platten dem Einfrieren der Pellets auf der Metallplatte überlegen. Das gilt für die Qualität des Pellet-Kryospermas, soweit die Qualität mit der Motilität beschrieben wird. Die unterschiedlichen Temperaturen der Metallplatte zwischen -40°C und -120°C erlauben in keinem Temperaturbereich die einfache Herstellung von Sperma-Pellets mit einer guten Endmotilität im Vergleich zum Einfrieren auf Kohlensäureschneepplatten.

ZUSAMMENFASSUNG

Für Untersuchungen zur Abhängigkeit der Qualität des Kryospermas von der Adaptationszeit und Adaptationstemperatur wurden 10 unausgesuchte Spender-Ejakulate aufgearbeitet. Bei Adaptationstemperaturen von $+5^{\circ}\text{C}$ und $+22^{\circ}\text{C}$ zeigte sich ein signifikanter Einfluß auf die Endmotilität. Adaptationszeiten von mehr als 60 Minuten erwiesen sich in beiden Temperaturbereichen als ungünstig für das Pellet-Kryosperma.

Bei einem Vergleich der Qualität des Pellet-Kryospermas, abhängig von der Gefrierung auf Kohlensäureschnee- oder Metallplatten ließ sich die Überlegenheit der Gefrierung auf dem Trockeneis beweisen. Auch bei unterschiedlichen Temperaturen der Metallplatte mit -20°C , -40°C , -60°C , -80°C , -100°C und -120°C war nicht ein den auf Trockeneis gefrorenen Pellets vergleichbares Qualitätsergebnis zu erreichen. Die Ergebnisse wurden durch Untersuchungen mit 10 Spenderejakulaten gewonnen.

Die Untersuchungsergebnisse wurden statistisch mit dem FRIEDMANN-Test gesichert.

Tabelle 1

Abhängigkeit der Spermienmotilität von der Adaptations-
temperatur und Adaptationszeit.

Temperatur + 5° C				+ 22° C		
Spender Nr.	Zeit 15'	30'	60'	15'	30'	60'
1	73,42	76,14	48,87	46,76	47,60	44,50
2	19,39	17,27	15,45	14,54	6,66	8,63
3	18,23	16,02	20,77	14,50	20,58	15,00
4	26,66	27,57	23,33	36,96	27,57	28,03
5	33,59	21,45	20,00	25,78	29,89	25,78
6	7,78	13,53	5,07	7,78	12,30	13,69
7	7,96	6,61	6,44	4,74	7,28	11,18
8	10,79	14,49	14,12	7,61	6,19	6,03
9	10,79	14,28	15,23	6,19	6,19	4,92
10	12,34	10,78	10,93	12,34	9,37	6,56

Tabelle 2

Vergleichende Untersuchung für die Qualität der auf Trockeneis und Metallplatten gefrorenen Sperma-Pellets. Die Metallplattentemperaturen liegen zwischen -20°C und -120°C .

Spen- der Nr.	Trocken- eis	Metallplatte					
	-79°C	-20°C	-40°C	-60°C	-80°C	-100°C	-120°C
1	21,66	2,33	12,77	13,20	13,33	22,77	12,22
2	36,31	16,57	8,15	12,63	8,55	3,81	1,75
3	73,67	26,89	43,48	29,37	21,80	15,81	21,24
4	13,72	19,18	5,96	6,97	12,94	4,65	6,11
5	51,51	18,78	23,63	25,90	21,21	18,78	31,06
6	11,86	16,80	7,60	9,73	8,53	3,46	16,00
7	24,76	17,77	16,98	11,58	6,55	13,65	7,30
8	58,78	31,08	46,48	42,43	36,35	49,72	50,67
9	52,15	14,96	8,92	10,00	12,00	21,07	19,38
10	14,09	4,24	2,92	2,21	0,69	6,06	1,81

LITERATURVERZEICHNIS

1. APLAS, M.: Untersuchungen zur Tiefkühlkonservierung menschlicher Ejakulate in Pellet-Form. Dissertation Erlangen 1976.
2. BARKAY, J.,
H. ZUCKERMAN,
M. HEIMAN: A new practical method of freezing and storing human sperm and a preliminary report on its use. Fert. Ster. 25, 399 (1974).
3. BEHRMAN, S. J.,
Y. SAWADA: Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. Fertil. Steril. 17, 457 (1966).
4. BREGULLA, K.,
P. HILTL: Homologe Insemination mit TG-N₂ oligozoospermen Ejakulaten. Jahrestagg. Dtsch. Ges. zum Studium d. Fertilität u. Sterilität, Freiburg 1973.
5. CASSOU, R.: La miniaturisation des paillettes. VI. Congr. de Repr. et Ins. Art. Paris, Juillet 1968.
6. ELIASSON, R.: Standards for investigation of human semen. Andrologie 3, 49 (1971).
7. MAHNER, J.: Dissertation Erlangen, 1976.
8. MATHESON, G. W.,
L. CARLBORG,
C. GEMZELL: Frozen human semen for arteficial insemination. Amer. J. Obstet. Gynec. 104, 495 (1969).
9. MAZUR, P.: Theoretical and Experimental Effects of the Cooling and Warming Velocity on the Survival of Frozen and Thawed Cells. Cryobiology 2, 181 (1966).
10. MAZUR, P.,
S. P. LEIBO,
R. H. MILLER: The Response of Bovine Red Cells to Freezing and Thawing as a Function of the Permeation of Glycerol. II. The Effects of Freezing. Cryobiology 8, 383 (1971).

11. MENKIN, M. F.,
P. LUSIS,
J. ZAIKIS,
J. ROCK: Refrigerant Preservation of
Human Spermatozoa.
Fertil. Steril. 15, 511 (1964).
12. MERYMAN, H. T.: The Interpretation of Freezing
Rates in Biological Materials.
Cryobiology 2, 165 (1966).
13. NAGASE, A.,
E. F. GRAHAM: Pelleted semen: Comparison of
different extenders and processes
on fertility of bovine spermatozoa.
V. Int. Congr. Anim. Reprod. &
A.I., Trento 4, 387 (1964).
14. PAUFLER, S. K.,
Mitautoren (Hrsg.): Künstliche Besamung und Eitrans-
plantation bei Tier und Mensch.
Band I und II.
M. & H. Schaper, Hannover 1974.
15. RUDOWSKY, R.: Untersuchungen zur Abhängigkeit
der Spermienmotilität bei der
Tiefkühlkonservierung von der
Adaptationszeit und zum Problem
des Abriebspermas.
Dissertation Erlangen 1976.
16. VASTERLING, H. W.: Die künstliche Besamung beim Men-
schen.
In: Paufler, S. K. u. Mitarb.,
Künstliche Befruchtung und Ei-
transplantation bei Tier und
Mensch. Band I, 156 - 186.
Hannover: M. & H. Schaper 1974.

LEBENS LAUF

Am 22.4.1943 wurde ich als 3. Sohn des Beamten Salar EMRAN (verstorben 1955) und seiner Ehefrau Johanna in Firuzkuh/IRAN geboren.

Von 1948 - 1954 besuchte ich die Volksschule "Masudi" in Firuzkuh. Nach siebenjähriger Unterbrechung der Schulzeit 1961 Beginn der Abendschule. 1967 Abitur in Teheran.

Aufenthalt in der BRD seit 1970. Nach einem Deutschkurs an der Universität München bestand ich die Aufnahmeprüfung zum Studienkolleg, um das Deutsch-Abitur nachzuholen. Nach bestandener Prüfung Beginn des Studiums der Zahnmedizin im Wintersemester 1971 an der Universität in München. 1972 Fortsetzung des Studiums an der Universität Erlangen-Nürnberg.

Vorphysikum 1973, Physikum 1974, zahnmedizinisches Staatsexamen 1977.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990